

④ 公開特許公報 (A)

平1-104075

④ Int. Cl. 1
C 07 D 475/14
G 01 N 27/30識別記号
8829-4C
E-7363-2G

④公開 平成1年(1989)4月21日

審査請求 未請求 発明の数 3 (全8頁)

④発明の名称 フラビン誘導体およびその製造方法

④特 願 昭62-262256

④出 願 昭62(1987)10月16日

特許法第30条第1項適用 昭和62年9月25日 社団法人日本化学会発行の「日本化学会第55回秋季年会講演予稿集Ⅱ」において発表

④発明者 上山智嗣 兵庫県尼崎市坂口本町8丁目1番1号 三菱電機株式会社
中央研究所内④発明者 磐田信 兵庫県尼崎市坂口本町8丁目1番1号 三菱電機株式会社
中央研究所内

④出願人 三菱電機株式会社

④代理人 弁理士 大岩増雄

東京都千代田区丸の内2丁目2番3号

外2名

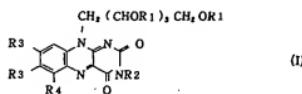
明細書

1. 発明の名称

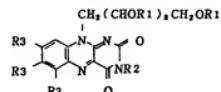
フラビン誘導体およびその製造方法

2. 特許請求の範囲

(1) 一般式

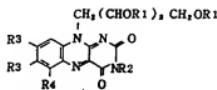
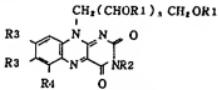


(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子またはアシル基を、R₄は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₅はアミノ基を表わす。)
で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、テオシアント酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解する、一般式



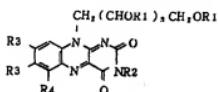
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子またはアシル基を、R₄は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₅はテオシアナト基またはメルカブト基を表わす。)
で示される6-テオシアナトフラビン誘導体の製造方法。

(2) 一般式



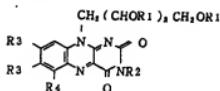
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素原子1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、チオシアノ酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一般式

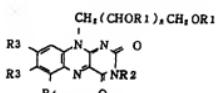


(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はチオシアナト基を表わす。)

で示される6チオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じてエステルを加水分解する一般式



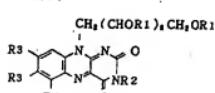
Cの発明のフラビン誘導体は、一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はチオシアナト基またはメルカブト基を表わす。)

で示されるものである。

この発明の別の発明のフラビン誘導体の製造方法は、一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす。)

で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化

(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はメルカブト基を表わす)

で示される6-メルカブトフラビン誘導体の製造方法。

3 発明の詳細な説明

(薬業上の利用分野)

この発明は、新規なフラビン誘導体およびその製造方法に関するものである。

(従来の技術)

従来、フラビン誘導体本体としては、例えばリボフラビンやルミフラビンが市販されていた。

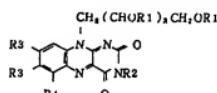
(発明が解決しようとする問題)

上記リボフラビンやルミフラビンを、例えばテトクロームCやルブレドキシン等の電子伝達タンパク質を標元するための電極の修飾剤として用いることは困難であった。

この発明は、従来に代わる新規なフラビン誘導体およびその製造方法を得ることを目的とする。

(問題点を解決するための手段)

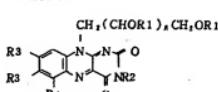
合物とした後、チオシアノ酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して、一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はチオシアナト基を表わす。)

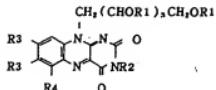
で示される6チオシアナトフラビン誘導体を得るものである。

この発明の別の発明のフラビン誘導体の製造方法は、一般式



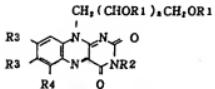
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす。)

で示される 6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、テオシアノ酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基を表わす。)

で示される 6-テオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はメルカブト基を表わす。)

オシアナト基である 6-テオシアナトフラビン誘導体は、文献上既知の 6-アミノフラビン誘導体（バイオケミストリイ、18, 2537(1980)等）を 15～40% の硫酸もしくは塩酸酸性水溶液中、1.5～5倍モルの亜硝酸ナトリウムと作用させ、6-ジアゾフラビン誘導体を生じさせた後、これを単離することなくテオシアノ酸カリウムと作用させることにより合成出来る。

また、6-テオシアナトフラビン誘導体を水溶液中、還元剤（例えばハイドロサルファイナトリウム、水酸化カクテナトリウム、ジオスレイトールなど）と作用させるか、または光照射下に EDTA と作用させることにより目的とする一般式 (I) 中、R₄がメルカブト基である 6-メルカブトフラビン誘導体が合成出来る。6-テオシアナトフラビン誘導体、および 6-メルカブトフラビン誘導体の何れも通常の再結晶法または分子ふるい、シリカゲルカラム、樹脂カラム等の精製法により単離することが可能である。

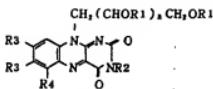
この発明のフラビン誘導体の製造方法の一実施

で示される 6-メルカブトフラビン誘導体を得るものである。

〔実施例〕

以下、この発明の実施例について述べるが、これらに限定されない。

この発明の新規なフラビン誘導体は一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基またはメルカブト基を表わす。)

で示される。この発明の新規なフラビン誘導体としては、例えば 6-テオシアナト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンおよび 6-メルカブト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンなどがある。

一般式(I)で示されるフラビン誘導体中、R₄がチ

メルカブト基である 6-テオシアナト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの合成について述べる。即ち、6-アミノ-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビン 1.00g (1.79 mmole) を、硫酸 10mL をおよび氷水 30mL の 0 °C 液槽中に懸濁する。97% 亜硝酸ナトリウム 19.05 mg (2.68 mmole) を 0 °C で添加後、15 分間同温で搅拌する。尿素 19.55 mg を 0 °C で加し、過剰の亜硝酸ナトリウムを分解して、さらに 15 分間搅拌する。充分に分解させた後、鉛和テオシアノ酸カリウム水溶液 0.85mL を 0 °C で加え、窒素ガスの発生が止むまで (約 30 分) 搅拌する。

25% アンモニア水 30mL を内温 150 以下で、最終液が pH 2 になるようにする。反応液をクロロホルムの 50mL で 3 回、合計 150mL で抽出を行い、合わせたクロロホルム溶液を無水硫酸ナトリウムで乾燥させる。減圧下溶液を留去させた後、残渣をシリカゲルカラム（溶出液：アセトニン : ベンゼン = 1 : 5）に付し、目的のフラクションを合わせ、減圧下溶液を留去する。残留物をクロロ

ホルムとヘキサンの配合物より再結晶することにより、目的の 6-テオシアント-2',3',4',5'-テトラアセチルリポフラビンの黄色結晶 3.67 mg が得られる。収率は、34.1% である。

なお、上記化合物が以下に示す測定結果により、目的化合物であることを同定した。

融点 138°-142°C

元素分析(%) 計測値 C, 51.92, H, 4.52, N, 11.62

実測値 C, 51.65, H, 4.52, N, 11.52

赤外線吸収スペクトル IR(KBr, cm⁻¹) 3470, 2150, 1740, 1580, 1535, 1215

核磁気共鳴 NMR (CDCl₃, δ ppm) 1.82, 2.09, 2.21, 2.31, 2.66, 2.76 (each 3H, s), 4.25, 4.44 (each 1H, d), 5.41 (4H, broad), 5.60 (1H, broad), 7.77, 8.61 (each 1H, s)

次に、この発明のフラビン誘導体の製造方法の一実施例の 6-メルカブト-2',3',4',5'-テトラアセチルリポフラビンの合成について述べる。即ち、上記のようにして得た 6-テオシアント-2',3',4',5'-テトラアセチルリポフラビンの

体を用いて下記方法により例えれば安定なフラビン修飾電極を製造することができる。

上記のように合成したフラビン誘導体を例えれば 0.1mg/1 ~ 100mg/1 の濃度で水または親水性溶媒に溶解し、この溶液中に、水または混在する有機溶剤等で洗浄した金、銀、白金などの金属性、酸化スズなどの金属酸化物、シリコンや炭素などの半導体、等の導電性基板を 0.1 秒から 1 時間浸せきすることによって、フラビン修飾電極を得ることができる。

下記に、例えれば金蒸着電極上へのテオシアントテトラアセチルリポフラビンの修飾について示す。即ち、第 2 図の金電極の正面図に示すように金を蒸着したガラス基板を蒸留水で洗浄した後、硝酸中に 10 分間浸せきして洗浄金電極とする。また、6-テオシアント-2',3',4',5'-テトラアセチルリポフラビンをリン酸緩衝液 (pH 7.0, 20mM) 中に 10mg/1 の濃度で溶解する。この水溶液に上述の洗浄金電極を 10 分間浸せきした後、水洗して、安定なフラビン修飾電極を得た。なお、図におい

0.05M りん酸と水素カリウム-りん酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) を用いた 5.10 × 10⁻⁴ M 濃度の溶液を調整した後、安定剤として EDTA2 ナトリウムを 1.0 × 10⁻⁴ M となるように加え試料溶液とする。

これに、ジオスレイトールを 8.0 × 10⁻⁴ M となるように加える。室温下、2 時間搅拌すると目的の 6-メルカブト-2',3',4',5'-テトラアセチルリポフラビンが生じる。第 1 図に可視紫外吸収スペクトル図を示す。

次に 6-メルカブト-2',3',4',5'-テトラアセチルリポフラビンの製造の他の方法について説明する。

EDTA2 ナトリウムを加えない以外は前述の実施例と同様に試料溶液を調整した後、窒素雰囲気下、ハイドロソルフアイトナトリウムを 8.0 × 10⁻⁴ M となるように加え室温で 1 時間 30 分搅拌する。本操作により生じた 6-メルカブト-2',3',4',5'-テトラアセチルリポフラビンの紫外吸収スペクトルは上記のそれと一致した。

なお、上記のようにして得られたフラビン誘導

て、(1)はガラス基板、(2)は金蒸着膜、(A)は 50mm、(B)は 3mm、(C)は 10mm、(D)は 2mm を示す。

サイクリックボルタシメントによる修飾電極の安定性試験

リン酸緩衝液 (pH 7.0, 20mM) 中に過塩素酸ナトリウムを 100mM の濃度で溶解し、アルゴン通気により脱酸素し、これを電解液として上記修飾電極のサイクリックボルタシメント (0 ~ -600mV vs. Ag/AgCl, 携引速度 50mV/s) を測定し、このときのサイクルによる還元ピークの高さの変化を示す特性図を第 3 図に示す。3 サイクル以降、還元ピークの高さは、ほとんど変化せず、6-テオシアント-2',3',4',5'-テトラアセチルリポフラビンが安定に金表面に吸着していることを示すのである。なお、図において、縦軸はピーク電流値 (μA) を横軸はサイクル (回) を示す。

テトクローム c の還元

テトクローム c を 330 μM の濃度になるように上記電解液に溶解し、この溶液中で上記フラビン修飾電極を用いてサイクリックボルタシメントを

行った結果をテトクローム c を含まない場合と比較して図 4 図のサイクリツクボルタモグラムに示す。酸化ビーグは認められず、大きく還元電流が流れようになることから、この修飾電極を用いることによって、テトクローム c を還元はできるが酸化はできないようになります。すなわち、電極からテトクローム c への一方の電子移動のみ起こすこと、が可能になることがわかる。

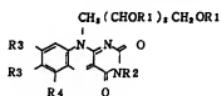
図において、(a)はチトクロム c を含まない時のサイクリツクボルタモグラム、(b)はチトクロム c を含むサイクリツクボルタモグラムを示す。又、縦軸は電流 (μA) を横軸は $Ag/AgCl$ 電極に対する電圧 (mV) を示す。

なお、電子伝達タンパク質として、チトクロームcの代りに、ルミフラビンを用いた場合も同様である。

〔発明の効果〕

以上説明したとおり、この発明は
一般式

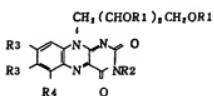
合物とした後、テオシアン酸塩と作用させ、また必要に応じエヌクルを加水分解して一般式



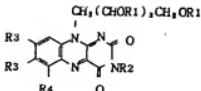
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基を表わす。)

で示される 6 チオシアナトフラビン誘導体の製造方法を得ることができる。

又、この発明の別の発明は
一般式



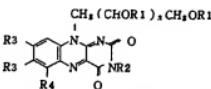
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基またはメルカプト基を表わす。)

で示される新規なフラビン銀 komplexe である。

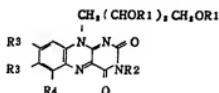
又この発明の別の発明は
一式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす)

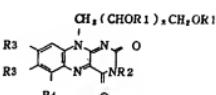
で示される 6-ニトロフラビン誘導体を活性化

で示される 6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化合物とした後、テオシアン酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解して一段式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はセオキシエトキ基を表す。)

で示される 6 チオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じエステルを加水分解して一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はメルカプト基を表す)。

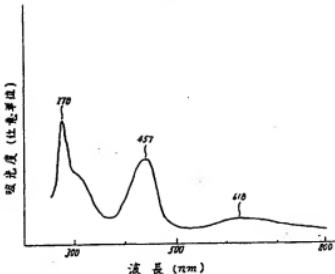
で示される6-メルカブトフラビン誘導体の製造方法を得ることができる。

4. 図面の簡単な説明

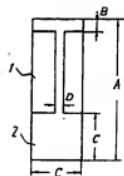
第1図はこの発明の一実施例の6-メルカブト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンの可視紫外吸収スペクトル図、第2図は金電極の正面図、第3図はこの発明の一実施例の6-チオシアナト-2',3',4',5'-テトラアセチルリボフラビンによる金電極の修飾に得られた修飾電極のサイクル(回)による還元ピークの高さ(μA)変化を示す特性図、第4図は上記修飾電極を用いたサイクリックボルタモグラムを示す。

代理人 大 岩 塚 雄

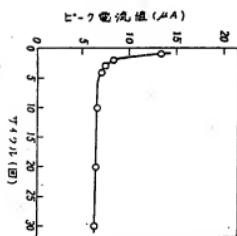
第1図



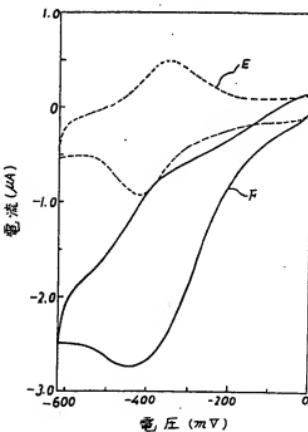
第2図



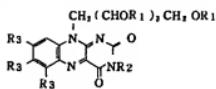
第3図



第4図



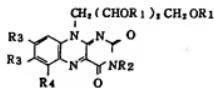
合物とした後、テオシアント酸塩と作用させ、また必要に応じエステルを加水分解する、一般式



(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はナオシアナト基を表わす。)

で示される6-テオシアナトフラビン誘導体の製造方法。

(a) 一般式

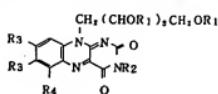


(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素原子1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす。)

で示される6-アミノフラビン誘導体をジアゾ化

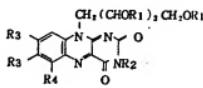
方法。

合物とした後、テオシアント酸塩と作用させ、また必要に応じエステル加水分解して一般式



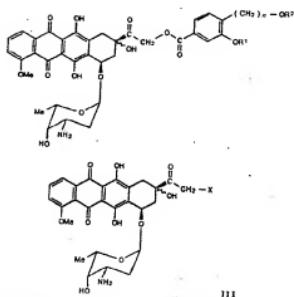
(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はテオシアナト基を表わす。)

で示される6-テオシアナトフラビン誘導体を得、これを還元した後、必要に応じてエステルを加水分解する一般式

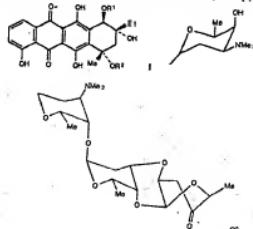


(式中、R₁は水素原子またはアシル基を、R₂、R₃は水素原子または炭素数1～4個の低級アルキル基を、R₄はアミノ基を表わす。)

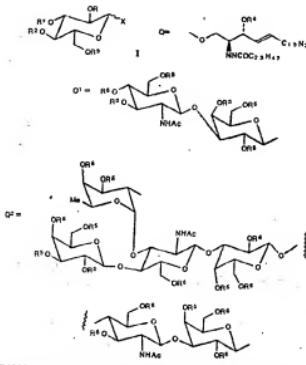
で示される6-アミノフラビン誘導体の製造



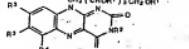
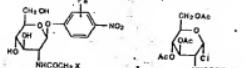
174595b Preparation of anthracycline derivatives as
statics. Berscheid, Hans Gerd; Fehlhaber, Hans; Wolfram
ch. A.-G.) Eur. Pat. Appl. 311,002 (CL C07H15/25), 12
1989, DE Pat. Appl. 3,733,885, 07 Oct 1981; 9 pp. The title
is given.



145000 $\times g$ for 10 min. cells. To 10 mg of the above α -D-glucosylphingolipids, Tomoya, Sato, Susumu, Ito, Yukiharu Institute of Medical and Dental Research [Japan], Kokai Tokkyo Koho 01 56 59 1875, 1980, 1981, 02 Mar 1988, JP Appl. 87/53,403 [1987, 53, 403]. To a mixture of R_1 (X = H or R_1 = H) and R_2 (H or R_2 = H) [at least one of R_1 or R_2 is oligosaccharide] in $CHCl_3$ (10 ml), R_1 and R_2 (H) were prep. by glycosylation of ceramides $CH(R_1)CH_2CH(R_2)OC(=O)NH_2$ (Meat; at least one R_1 or R_2 = Ac) with $CH_2=CHOC(=O)NH_2$ (Acryl- β -glucosaminide; R_1 = Ac) and deprotection of the resulting β -D-glucosylceramides by a mixture of CH_3COCl and CH_3COOH (1:1) in $CHCl_3$ (10 ml). To a mixture of R_1 and R_2 (H) in $CHCl_3$ (10 ml), R_1 (X = H or R_1 = H) (0.064 mmol), and 300 mg mol. sieve 4A (100 mg) and $CF3SO_2NH_2$ was injected and the mixt. was stirred 1 h at room temp. Then R_2 (H or R_2 = H) (0.064 mmol) was added and the mixt. was washed with BuNH in $MeOH$ - THF , acetylated with Ac_2O ($CHCl_3$), and then dialyzed with $MeOH$ in $CHCl_3$ (10 ml) for 1 h. After the final $CHCl_3$ wash, 7.10% $1 = X = \beta$ (Q, $R_1 = Q$, $R_2 = R_1$) (H) (V).



III: 174600W A process for preparation of fluorinated *p*-nitrophenyl N-acetyl- β -D-glucosaminides and their use as substrates for determination of N-acetyl- β -D-glucosaminidase. Kurihara, Toshio; Nishikawa, Toshio; Kamimura, Minoru (Sapporo, Kurishara, Ltd.) Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 01 65,391 [89 65,391] (Cl. C07H15/203), 14 Mar 1989, Appl. 87/225,330, 10 Sep 1987; 5 pp.



= H, acyl; R₂, R₃ = H, C₁₋₄ alkyl; R⁴ = thiocyanato, NH) are prepared by (1) diazotization of I (R⁴ = NH₂), followed by treatment with (1) thiocyanato salt to I (R⁴ = thiocyanato) and (2) redn. of I (R⁴ = thiocyanato) and optional hydrolysis of the resulting ester. Treatment of I (R⁴ = NH₂) with Ac₂O, R² = H; R³ = Me; R⁴ = NH₂) with NaNO₂ in H₂SO₄ followed by treatment with KSCN gave 34.1% I (R⁴ = thiocyanato). A Ag electrode modified by the latter was prepared and

111: 174
arabonat
Nakamura
Nacional
C07C59/1
Alkali me
EtOH, Pr
with O_2 α
Thus, O_2
10-30 min
of methan
cooling, m

R¹ = SQ; useful for glycosidation. Ac) with 3 = Cl; R¹ = SAc, R² = 2,13 mmol R¹ = CO₂Li, 1,2-O-tetra(1:1) was a 88.65% I which was NaOH in CO_2Na , R² neuroaxis-111: 1746 for induce Tomoya; Research) C08B37/00

Oligogalacto-
-alkyl, pre-
-or inducing
-glycosidat-
 $\text{C}_6\text{H}_5\text{Ph}$) (IV
- H , $n = 0$
- allyl, R^4
- in the pres-
- gave 75.70%
- which was
- $R^3 = \text{CH}_2\text{O}^-$
- with $(\text{COCl})_2$
- anath gave a
- allyl, $n = 8$)
- NaHPO_4 in
- $\text{R}^3 = \text{allyl},$
- MeOH quan-
- VI).